

## **ACTUALIZACION EN ESTUDIOS DE PATERNIDAD POR ANALISIS DE ADN**

**Penacino, Gustavo Adolfo.**

### **RESUMEN**

*A partir del descubrimiento de polimorfismos hipervariables en el ADN [1], y de la posibilidad de emplearlos en identificación humana, lograda por Jeffreys [2], los niveles de certeza se incrementaron enormemente, a más del 99,99 %, superando incluso a la aplicación de todos los sistemas anteriores (grupos sanguíneos, HLA, etc.) en conjunto.*

*Actualmente, los laboratorios de análisis de ADN emplean tecnología de última generación que permite el estudio de 15 marcadores variables en una única reacción de PCR, con el auxilio de secuenciadores automáticos. Un software especial interpreta los datos obtenidos, reduciendo al mínimo la posibilidad de error metodológico ([www.secretpaternity.com](http://www.secretpaternity.com)).*

**PALABRAS CLAVE:** ADN, paternidad, filiación, paternity testing, DNA, genética, forense.

### **INTRODUCCION**

En orden cronológico, puede decirse que el puntapié inicial de los análisis de ADN se produce en abril de 1985, cuando el primer caso judicial es resuelto por aplicación de técnicas moleculares de caracterización de secuencias hipervariables en el ácido desoxirribonucleico (ADN) [2].

Los resultados obtenidos mediante el estudio de las Huellas Digitales Genéticas (HDG) o "DNA-Fingerprinting" permitieron aclarar una disputa por inmigración a Gran Bretaña. Poco tiempo después, una corte civil inglesa acepta la evidencia de ADN en un caso de paternidad discutida.

Recién a partir del año 1987, las pruebas de ADN son admitidas como evidencia en las Cortes Criminales de Gran Bretaña y de Estados Unidos.

En 1988 se desarrollan técnicas de amplificación de ADN de pequeñas regiones variables del genoma, partiendo de sólo 1700 células diploides, equivalentes a unos 10 nanogramos de ADN [3].

Estas técnicas, denominadas genéricamente *reacción en cadena de la polimerasa* ("Polymerase Chain Reaction" o PCR), emplean iniciadores o *primers*, que son secuencias de ADN complementarias de las zonas flanqueantes de la zona de interés, que es amplificado por una ADN polimerasa durante ciclos térmicos adecuados, lográndose millones de copias de la región.

En 1989, y a causa de estudios de dudosa verosimilitud efectuados por la empresa americana Lifecodes Corp. en un caso criminal, se discute en los Estados Unidos la validez científica de estas pruebas para uso forense [4], resultando en una revisión crítica de las técnicas utilizadas por los distintos grupos de investigadores.

En 1990, el U.S. Congress Office of Technology Assessment concluye que la identificación de individuos basada en las pruebas de ADN es científicamente válida, siempre que se disponga de la certeza metodológica de su realización. La estandarización de las mismas ha sido encarada, entre otros, por los laboratorios del FBI [5].

La razón fundamental de la amplia difusión de estas técnicas estriba en el hecho de que, mientras la serología clásica y los marcadores genéticos evaluables fenotípicamente presentan un número muy limitado de genotipos posibles, el continuo descubrimiento de nuevas regiones hipervariables en el ADN resuelve el problema de la identificación certera de individuos y del establecimiento de vínculos biológicos de parentesco.

En los primeros trabajos con utilización de las técnicas de PCR, si bien resultaba posible evaluar regiones de una muestra de ADN que podía estar muy degradada, la escasa variabilidad entre los individuos componentes de la población general conspiraba contra la certeza incriminatoria del análisis: era factible que una evidencia coincidiera con un sospechoso por azar, y mucho más aún, que a un padre alegado le fuera atribuída erróneamente la paternidad biológica de un descendiente putativo.

A partir de los '90, la posibilidad de evaluar un gran número de sitios variables localizados en diferentes zonas del genoma [6], permitió analizar, aunque fuera parcialmente, muestras de tejido humano quemado y en estado de putrefacción [7], como las derivadas de los atentados a la Embajada de Israel y a la mutual israelita AMIA [8,9,10].

Posteriormente, la incorporación de un número aún mayor de sistemas hizo posible el establecimiento de vínculos biológicos de parentesco a través de secuencias de ADN de muy pequeño tamaño, con lo cual se logró la identificación de cadáveres momificados, con reducción ósea total o quemados.

Actualmente, los laboratorios de análisis de ADN emplean tecnología de última generación que permite el estudio de 15 marcadores variables en una única reacción de PCR, con el auxilio de secuenciadores automáticos. Un software especial interpreta los datos obtenidos, reduciendo al mínimo la posibilidad de error. Por otra parte, las nuevas metodologías de conservación de muestras y extracción de ADN, permiten la remisión de las muestras por correo postal sin riesgos [11].

## **MATERIALES Y METODOS**

### 1- Extracción del ADN:

La muestra biológica (sangre, uñas, hisopados o cualquier otro tejido que contenga células humanas con núcleo) se somete a la acción de detergentes, que disuelven los lípidos; y enzimas proteolíticas, que cortan las proteínas.

Luego de incubar la mezcla una noche a 60 grados centígrados, se produce la ruptura de la estructura celular liberando todo su contenido a la solución.

La mezcla se limpia mediante sucesivos lavados con solventes orgánicos (fenol, cloroformo), que coagulan proteínas y extraen los lípidos, y finalmente el ADN se separa por precipitación con alcohol en medio salino.

Eventualmente, en los casos de manchas antiguas o huesos, se realizan purificaciones posteriores por diálisis o adsorción a soportes sólidos.

Existen métodos alternativos en los cuales la muestra sanguínea se deposita sobre un papel especial, que la mantiene inalterada por años a temperatura ambiente. Previo al análisis, se cortan con un sacabocados pequeños fragmentos del papel (alrededor de 1 mm) y se extraen las impurezas mediante lavados. El papel así procesado, con el ADN adherido, se analiza directamente colocándolo en la mezcla de amplificación.

## 2- Análisis del ADN:

Existen dos metodologías diferentes:

a) Corte con enzimas de restricción, corrimiento electroforético en geles de agarosa, transferencia a una membrana de nylon o celulosa y tratamiento con sondas de locus múltiple o de locus específico. Estas técnicas están cayendo en desuso, por lo cual no serán tratadas aquí.

b) Amplificación mediante PCR o reacción en cadena de la polimerasa: es un proceso que consiste en imitar una actividad normal de la célula: la copia de ADN, aunque en este caso limitado a pequeños fragmentos, en los cuales están ubicadas las regiones variables.

Para ello, se coloca en cada tubo una porción del ADN extraído de cada persona y una mezcla que contiene nucleótidos, sales, una enzima que "copia" ADN (denominada *polimerasa*) y los "primers" que reconocen la zona variable.

La mezcla se somete a variaciones de temperatura en un *ciclador térmico*, que produce sucesivamente tres temperaturas diferentes: una que desnaturaliza o separa las cadenas del ADN, otra que facilita que los "primers" reconozcan y se adhieran a la región a copiar, y la tercera que permite la extensión de la cadena

copiada, mediante la unión de los nucleótidos que se encuentran en la solución, con la ayuda de la polimerasa.

Luego, los amplificadores se someten a un campo eléctrico en el interior de un soporte semisólido o gel (*electroforesis*). Como el ADN está cargado negativamente, se dirige hacia el polo positivo, los fragmentos pequeños más rápido que los grandes, produciendo su separación.

Finalmente, los fragmentos separados se visualizan mediante diferentes métodos:

- Radiactivos: si uno de los nucleótidos estaba marcado radiactivamente, basta poner el gel en contacto con una película radiográfica, que se revela para observar las bandas.

- Tinción con plata: se trata el gel con sales de plata, que por su carga positiva son atraídas por la carga negativa de los fragmentos de ADN, y se revela de modo similar a una fotografía.

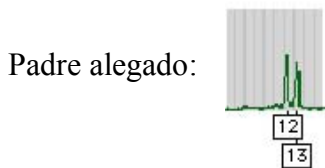
Tanto los métodos radiactivos como los de tinción con plata están cayendo en desuso, y en la actualidad son empleados solamente por laboratorios que poseen un escaso volumen de trabajo.

- Sistemas automatizados: son los de última generación, en los cuales al proceso de electroforesis lo efectúa un secuenciador automático, que lee mediante un *rayo laser* los "primers", marcados con un fluorocromo, adheridos a las zonas variables. Una computadora permite determinar qué variantes son las que se encuentran en cada muestra.

## RESULTADOS Y DISCUSION

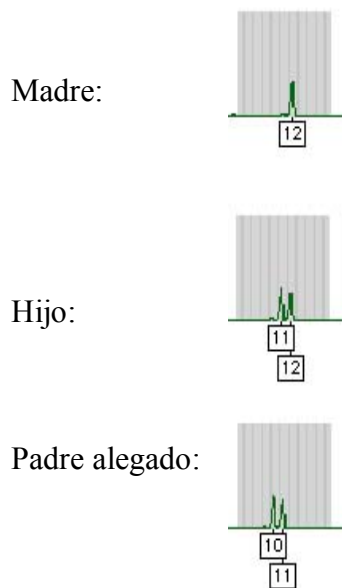
Según las metodologías empleadas, los resultados se visualizan como "bandas" (en los formatos radiactivos o de tinción) o como "picos" en un gráfico (sistemas automatizados). Dado que la interpretación es idéntica, en los ejemplos utilizaremos los gráficos obtenidos de un secuenciador automático.

Considerando que cada individuo hereda una variante de su madre y la otra de su padre biológico, supongamos los siguientes resultados para un hipotético "sistema A":



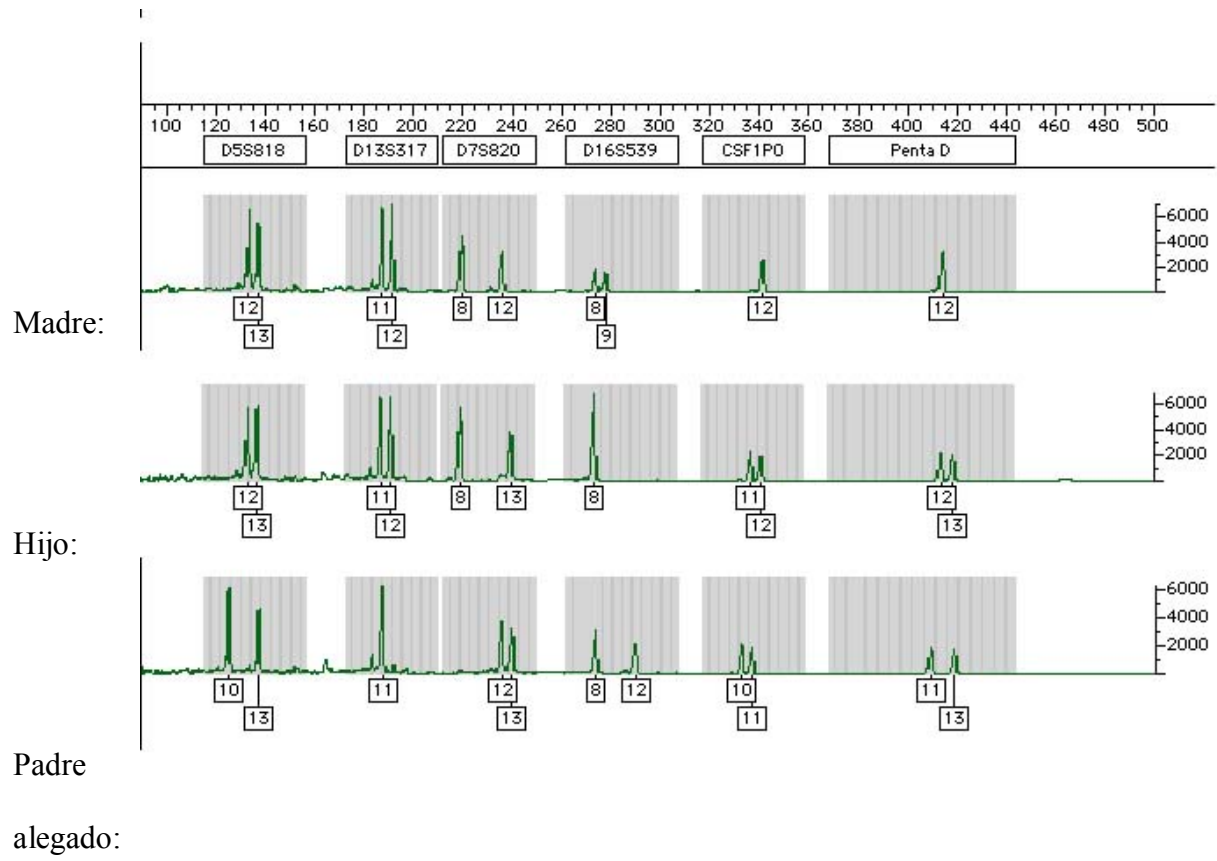
Es evidente que el hijo comparte una variante con su madre y la otra con su padre alegado, por lo cual podría ser hijo de ambos. Sin embargo, esa situación puede darse por azar, ya que hay muchos individuos de la población general que presentan esa variante compartida.

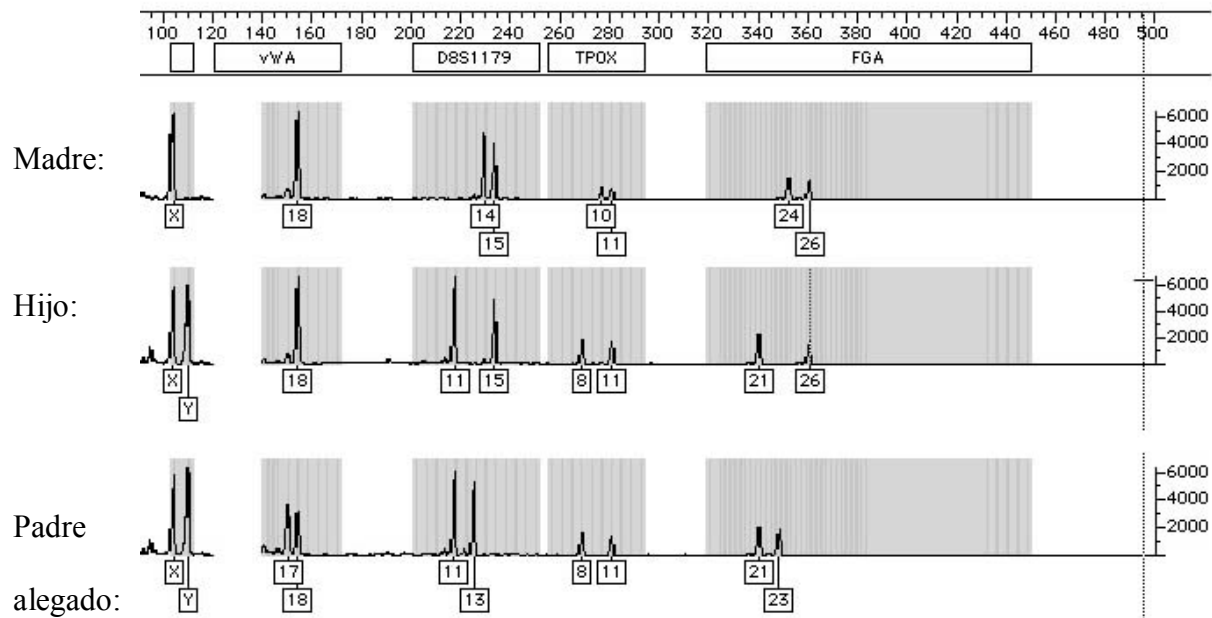
Entonces, repetimos el estudio con otro sistema, que analizará una zona variable diferente. El resultado para ese "sistema B" podría ser:

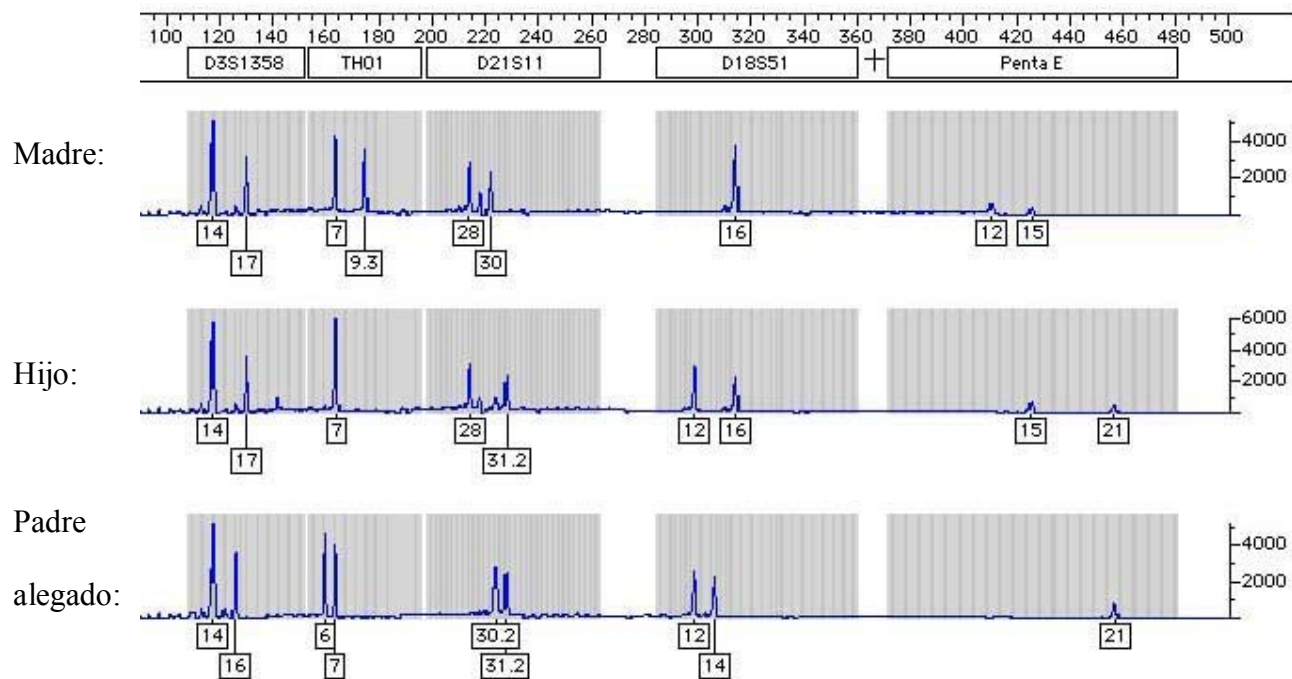


y se confirmaría la inclusión. Para que el estudio resulte suficientemente creíble, se acepta a nivel mundial que deben analizarse un mínimo de 12 sistemas de microsatélites, por supuesto, con inclusión en todos los casos. Para las técnicas actuales automatizadas, ello no presenta ningún inconveniente, ya que existen métodos de amplificación de 15 regiones variables en una sola reacción.

El estudio completo, con sistemas de última generación, como los empleados en el Servicio de Huellas Digitales Genéticas (FFyB-UBA), se vería así:

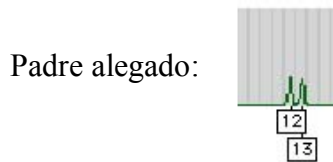
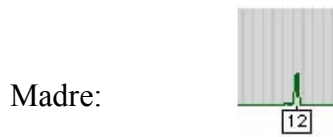






En el ejemplo anterior, se observan 15 sistemas variables y además el denominado "amelogenina", que sirve para determinación de sexo: en los varones se aprecian dos picos ("XY") y en las mujeres, sólo uno ("XX").

Otra posibilidad para el sistema B sería:



que indicaría la exclusión del padre alegado como padre biológico. Para asegurarse que no se deba a una falsa exclusión debida a una mutación, se sugiere continuar el estudio hasta observar al menos tres situaciones como ésta (de no compartición de variantes entre padre e hijo alegado).

Las variantes mencionadas se codifican por convención mediante un número (ubicado en el esquema en la parte inferior de cada pico), que expresa el número de veces que está repetida la secuencia que caracteriza al sistema. Así, en nuestro hipotético "sistema A", los resultados se expresarían como:

Madre: 8-12.

Hijo: 8-13.

Padre alegado: 12-13.

Cualquier otro estudio, realizado en cualquier lugar del mundo, del mismo "sistema A", debe necesariamente arrojar los mismos resultados numéricos. Si eso no ocurre, alguno cometió un error.

Finalmente, se realiza un cálculo estadístico de la probabilidad de paternidad e índice de paternidad, basándose en análisis efectuados previamente de las variantes observadas en individuos no relacionados de la población general. Cuanto menos frecuentes en la población sean las variantes obtenidas, mayores serán la probabilidad y el índice de paternidad.

Habitualmente, para individuos vivos, la "probabilidad de paternidad" es superior al 99,99%. Por ejemplo, un "índice de paternidad" de  $1,2 \times 10^6$  indica que 1 de cada 1200000 individuos de la población general podrían ser asignados como padres biológicos del hijo en cuestión, sin serlo, es decir, por azar [11].

## REFERENCIAS

- [1] Wyman, A. R.; White, R. (1980). A highly polymorphic locus in human DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 6754-6758.
- [2] Jeffreys, A. J.; Brookfield, J. F. Y. and Semeonoff, R. (1985b). Positive identification of an immigration test-case using human DNA fingerprints. Nature 317: 818-819.
- [3] Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S. and Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.
- [4] Lander, E. S. (1989) DNA fingerprinting on trial. Nature 339: 501-505.
- [5] FBI Academy (1989). Proceedings of the International Symposium on the Forensic Aspects of DNA Analysis. Quantico, Virginia, June 19-23.

[6] Edwards, A.; Civitello, A.; Hammond, H. A. and Caskey, C. T. (1991). DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. *Am. J. Hum. Genet.* 49: 746-756.

[7] Penacino, G., Sala, A. and Corach, D. (1994). "Post Mortem Molecular Identification. Biological kinship Established by DNA Analysis". *Adv. in For. Haem.* 5. Springer- Verlag. p. 289-291.

[8] Corach, D.; Penacino, G.; Guinther, Ch.; Just, J. and Sotelo, A. (1994) Dealing With Human Remains Sampled in Disaster Areas: The Case of the Israeli Embassy Explosion Occured in Buenos Aires. *Adv. in For. Haem.* 5: 259-261.

[9] Corach, D.; Sala, A; Penacino, G. and Sotelo, A. (1996) Mass disasters: rapid molecular screening of human remains by means of STR typing. *Electrophoresis* 16: 1617-1623.

[10] Penacino, Gustavo A. (1997) Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Publicada en [www.adn.ac/tesis](http://www.adn.ac/tesis)

[11] Secretpaternity.com, estudios de paternidad bajo secreto absoluto. Publicado en [www.secretpaternity.com](http://www.secretpaternity.com) ó [www.adn.ac](http://www.adn.ac)

## **DATOS DE CONTACTO**

*Dr. Gustavo A. Penacino, Bioquímico, Doctor en Genética y Biología Molecular de la UBA, Presidente de la Sociedad Argentina de Genética Forense ([www.sagf.org](http://www.sagf.org)), Coordinador del sitio de Internet "[www.secretpaternity.com](http://www.secretpaternity.com), estudios de paternidad bajo secreto absoluto" e integrante del Servicio de Huellas Digitales Genéticas (FFyB - UBA), Junín 956, 1113 Buenos Aires, Argentina. e-mail: [gpena@ffyb.uba.ar](mailto:gpena@ffyb.uba.ar), [presidente@sagf.org](mailto:presidente@sagf.org) ó [gpenacino@secretpaternity.com](mailto:gpenacino@secretpaternity.com)*